

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.14.006

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230705.1103.002.html>(2023-07-05)IL-35 表达对小鼠脾脏 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群分化的影响*张志强¹, 杨鲁宁², 刘恒², 王朝霞³, 张晓宁^{3△}

[1. 天津市南开医院病理科 300100; 2. 中国人民武装警察部队山东总队泰安支队卫生队, 山东泰安 271000; 3. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所), 济南 250000]

[摘要] **目的** 构建小鼠白细胞介素(IL)-35 基因表达质粒,探讨 IL-35 表达对小鼠脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群分化的影响。**方法** 采用 PCR 法扩增获得小鼠 IL-35 基因全长片段,将该片段连入鼠干细胞病毒载体(pMSCV-GFP)多克隆位点区,获得携带 IL-35 基因的质粒载体 pMSCV-IL-35-GFP。将 9 只雄性 C57BL/6J 小鼠分为 3 组:PBS 组、pMSCV 组和 pMSCV-IL-35 组,分别向 3 组小鼠尾静脉注射 PBS、pMSCV-GFP 空载质粒和 pMSCV-IL-35-GFP 质粒。72 h 后分离小鼠脾脏,采用实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)检测 IL-35 亚基 EB 病毒诱导基因 3(Ebi3)和 IL-12a mRNA 相对表达水平;采用流式细胞术检测 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群百分比,并进一步检测 CD8⁺ T 淋巴细胞免疫功能分子颗粒酶 B(Gzmb)和调节性 T 淋巴细胞(Tregs)细胞特异转录因子叉头/翅膀状螺旋转录因子 3(Foxp3)mRNA 相对表达水平。**结果** RT-qPCR 结果显示,与 PBS 组或 pMSCV 组比较,pMSCV-IL-35 组小鼠脾脏 Ebi3、IL-12a mRNA 相对表达水平均明显升高($P<0.001$);流式细胞检测结果显示,与 PBS 组或 pMSCV 组比较,pMSCV-IL-35 组小鼠脾脏 CD8⁺ T 淋巴细胞百分比明显降低($P<0.001$),而 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 百分比明显升高($P<0.001$),并且 Gzmb mRNA 相对表达水平明显降低($P<0.01$),Foxp3 mRNA 相对表达水平明显升高($P<0.01$)。**结论** IL-35 可以抑制效应性 T 淋巴细胞的活性,促进 Tregs 亚群分化发挥免疫调节作用,这将为 IL-35 基因应用于体内免疫治疗提供理论依据。

[关键词] 白细胞介素 35;调节性 T 细胞;细胞分化;免疫调节**[中图法分类号]** R392**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)14-2115-06Effect of interleukin 35 expression on differentiation of splenic CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets in mice*ZHANG Zhiqiang¹, YANG Luning², LIU Heng², WANG Zhaoxia³, ZHANG Xiaoning^{3△}

(1. Department of Pathology, Tianjin Municipal Nankai Hospital, Tianjin 300100, China; 2. Tai'an Detachment Health Team, Shandong Corps of Chinese People's Armed Police Force, Tai'an, Shandong 271000, China; 3. School of Clinical and Basic Medicine/Institute of Basic Medicine, Shandong First Medical University (Shandong Provincial Academy of Medical Science, Jinan, Shandong 250000, China)

[Abstract] **Objective** To construct the mouse interleukin (IL)-35 gene expression plasmid, and to investigate the effects of IL-35 expression on the differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in mouse spleen. **Methods** The PCR method was adopted to amplify for obtaining the full-length fragment of mouse IL-35 gene, which was connected into the polyclonal loci region of mouse stem cell viral vector (pMSCV-GFP), and the plasmid vector pMSCV-IL-35-GFP carrying IL-35 gene was obtained. Nine male C57BL/6J mice were divided into three groups: the PBS group, pMSCV group and pMSCV-IL-35 group. The PBS, pMSCV-GFP no-load plasmid and pMSCV-IL-35-GFP plasmid were injected by the tail vein in the three groups,

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(202002050100);山东省中医药科技项目(2020M063);山东第一医科大学(山东省医学科学院)青年科学基金培育资助计划项目(202201-016)。 作者简介:张志强(1988—),主治医师,硕士,主要从事基础病理及组织病理诊断研究。

△ 通信作者, E-mail: zhangxiaoning@tmu.edu.cn。

respectively. After 72 h, the mouse spleen was isolated. The real-time reverse transcription-PCR (RT-qPCR) was adopted to detect the relative levels of IL-35 subunit Ebi3 and IL-12a mRNA. The flow cytometer was adopted to detect the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes subsets, and the relative expression levels of CD8⁺ T lymphocyte immune function molecule granzyme B (Gzmb) and regulatory T cells (Tregs) specific transcription factor forkhead/winged helix family transcription factor 3 (Foxp3) mRNA were detected.

Results The RT-qPCR results showed that compared with the PBS group or pMSCV group, the relative expression levels of mouse spleen Ebi3m and IL-12a mRNA in the pMSCV-IL-35 group were significantly increased ($P < 0.001$). The flow cytometer detection results showed that compared with the PBS group or pMSCV group, the percentage of CD8⁺ T lymphocytes in the pMSCV-IL-35 group was significantly decreased ($P < 0.001$), the percentage of CD4⁺ CD25⁺ Tregs was significantly increased ($P < 0.001$), moreover, the Gzmb mRNA relative expression level was significantly decreased ($P < 0.01$), and the relative expression level of Foxp3 mRNA was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** IL-35 could inhibit the activity of effector T lymphocytes, promote the differentiation of Tregs subset and play the immune regulatory effect, which could provide the theoretical basis for the application of IL-35 gene in vivo immune therapy.

[Key words] interleukin 35; regulatory T cells; cell differentiation; immune regulation

调节性 T 淋巴细胞(regulatory T cells, Tregs)是一类特殊的 T 淋巴细胞群,能够有效抑制 T 淋巴细胞对自体或异体抗原的免疫反应,是治疗自身免疫性疾病和器官移植免疫排斥反应的首选^[1-5],其中 CD4⁺ 叉头/翅膀状螺旋转录因子 3⁺ Tregs(CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs)的研究和应用最为广泛^[6]。研究表明,CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs 的免疫抑制作用可依赖于白细胞介素(interleukin, IL)-35 的参与^[7-8]。IL-35 是继转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 和 IL-10 之后发现的抑制性细胞因子,由两个亚基组成[α 链 IL-12A/p35 和 β 链 EB 病毒诱导基因 3(Ebi3)],与 IL-12、IL-23、IL-27 共同构成了 IL-12 细胞因子家族^[9-10],最早发现由天然 Tregs 分泌,能够促进 Tregs 的体外增殖^[7,11]。本研究将构建小鼠 IL-35 基因表达质粒,通过尾静脉注射到小鼠体内,探讨 IL-35 表达对小鼠脾脏中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞亚群分化的影响,为 IL-35 基因应用于体内免疫治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康雄性无特殊病原体(SPF)级 C57BL/6J 小鼠(8~12 月龄)9 只,体重 18~22 g,购自北京军事医学科学院实验动物中心,饲养于天津医科大学 SPF 级实验动物中心,小动物护理及实验方案经天津医科大学实验动物伦理委员会批准。

1.1.2 实验试剂

基因表达载体为鼠干细胞病毒载体(pMSCV-GFP),小鼠 IL-35 基因来自质粒 pcDNA3.1-IL-35,均由天津医科大学刘义老师惠赠。1×磷酸盐缓冲液(PBS)、红细胞裂解液购自北京索莱宝科技有限公司,

TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂 HiScript II Q Select RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)、实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)试剂 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。流式标记荧光抗体:异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗小鼠 CD4 抗体、FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体、藻红蛋白(PE)标记的抗小鼠 CD8 抗体、PE 标记的抗小鼠 CD25 抗体购自美国 eBioscience 公司。qPCR 检测所用的引物、内参基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)引物(货号:B661304)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 IL-35 基因表达载体(pMSCV-IL-35-GFP)的构建

采用 PCR 法扩增获得小鼠 IL-35 基因全长片段,将该片段连入 pMSCV-GFP 多克隆位点区,获得携带 IL-35 基因的质粒载体 pMSCV-IL-35-GFP,测序验证重组载体无碱基突变。

1.2.2 pMSCV-IL-35-GFP 质粒注射

将 9 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组:PBS 组、pMSCV 组和 pMSCV-IL-35 组,每组 3 只,3 组小鼠的体重及活跃状态没有明显区别。分别向 3 组小鼠尾静脉注射 PBS、pMSCV-GFP 空载质粒和 pMSCV-IL-35-GFP 质粒。72 h 后分离每只小鼠脾脏。

1.2.3 小鼠脾脏 Ebi3、IL-12a mRNA 相对表达水平的检测

采用 TRIzol 法抽提每只小鼠脾脏总 RNA,超微量分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, RNA 浓度 $> 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 260、280 nm 处吸光度值比值(A_{260}/A_{280})

为1.8~2.2,说明提取的总 RNA 质量合格。采用实时荧光定量逆转录 PCR(reverse transcription-quantitative real-time PCR,RT-qPCR)检测小鼠脾脏 Ebi3

和 IL-12a mRNA 相对表达水平,GAPDH 为基因表达内参,每个样品设 3 次重复。检测 Ebi3、IL-12a mRNA 所用的引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物(bp)
Ebi3	GTTCTCCACGGTGCCCTAC	CGGCTTGATGATTGCGCTC	100
IL-12a	CCACCCTTGCCCTCCTAAA	GCCGTCTTACCATGTTCATCT	121
Gzmb	GACCCAGCAAGTCATCCCTA	CCAGCCACATAGCACACATC	186
Foxp3	CTGCCTTGGTACATTCTGTGA	CCAGATGTTGTGGGTGAGTG	101

1.2.4 流式细胞术检测小鼠脾脏 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群

摘取每只小鼠的脾脏并剪碎,在 200 目细胞筛上研磨得到细胞悬液,用红细胞裂解液处理,PBS 洗涤后离心获得淋巴细胞。按每管 2×10⁵ 个细胞分成 4 组:第 1 组加入 FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体;第 2 组加入 PE 标记的抗小鼠 CD8 抗体;第 3 组加入 FITC 标记的抗小鼠 CD4 抗体和 PE 标记的抗小鼠 CD25 抗体,4℃避光孵育 30 min,用 PBS 清洗 1 次,用流式细胞仪进行检测;第 4 组未标记抗体的细胞作为对照。

1.2.5 小鼠脾脏颗粒酶 B(Gzmb)、Foxp3 mRNA 相对表达水平的检测

为进一步验证流式细胞术所检测的 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群分化情况,采用 RT-qPCR 检测 CD8⁺T 淋巴细胞免疫功能分子 Gzmb^[12] 及 Treg 细胞特异转录因子 Foxp3^[6] mRNA 相对表达水平,GAPDH 为基因表达内参,每个样品设 3 次重复。检测 Gzmb、Foxp3 mRNA 所用的引物序列见表 1。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,计量资料采

用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间多重比较采用 Bonferroni 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠脾脏 Ebi3 和 IL-12a 基因的表达水平

与 PBS 组或 pMSCV 组比较,pMSCV-IL-35 组小鼠脾脏 Ebi3 和 IL-12a mRNA 相对表达水平明显升高($P<0.001$),见表 2。

2.2 IL-35 表达对脾脏 T 淋巴细胞分型的影响

与 PBS 组或 pMSCV 组比较,pMSCV-IL-35 组小鼠脾脏 CD8⁺T 淋巴细胞百分比明显降低($P<0.001$),CD4⁺CD25⁺Tregs 百分比则明显升高($P<0.001$),见图 1~3、表 3。

2.3 IL-35 表达对脾脏 CD8⁺T 淋巴细胞 Gzmb 基因和 CD4⁺CD25⁺Tregs Foxp3 基因表达的影响

进一步验证 CD4⁺和 CD8⁺T 淋巴细胞亚群分化情况,结果显示:与 PBS 组或 pMSCV 组比较,pMSCV-IL-35 组 Gzmb mRNA 表达水平明显降低($P<0.01$),而 Foxp3 mRNA 表达水平明显升高($P<0.01$),见表 4。

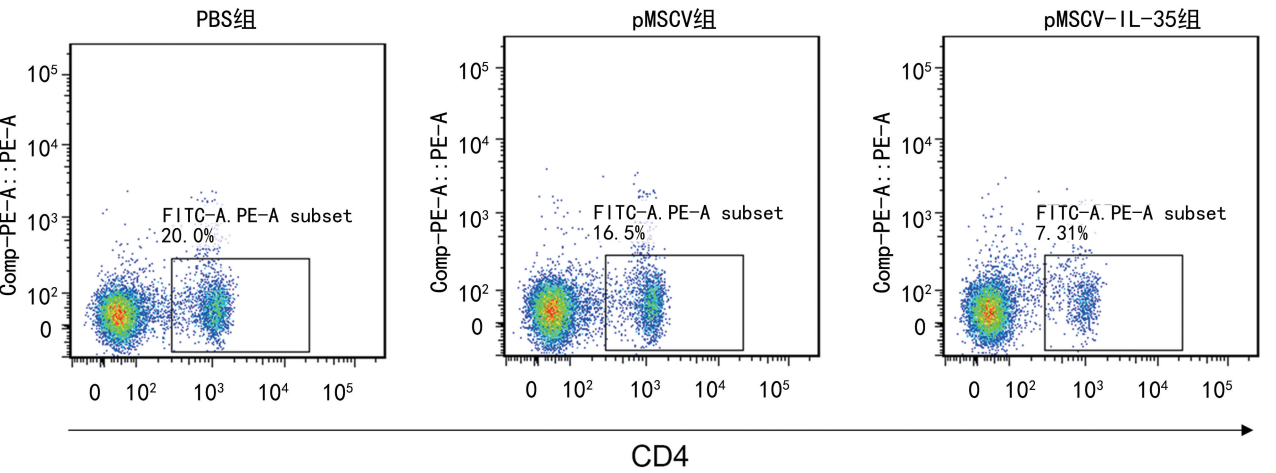


图 1 流式细胞术检测脾脏总 CD4⁺T 淋巴细胞的百分比

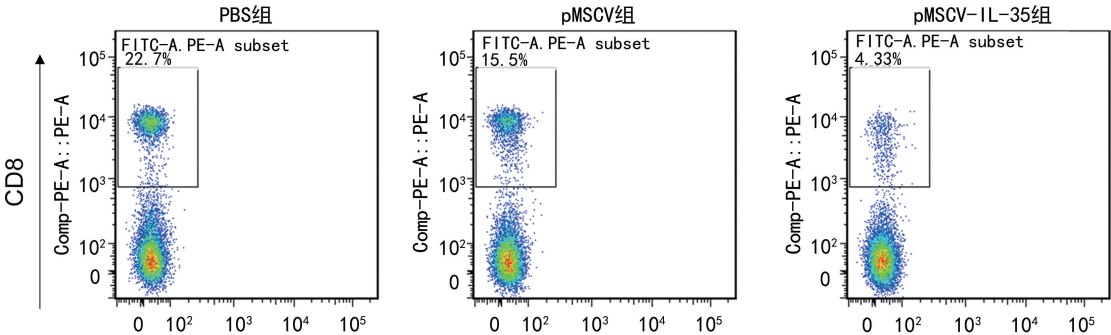


图 2 流式细胞术检测脾脏总 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分比

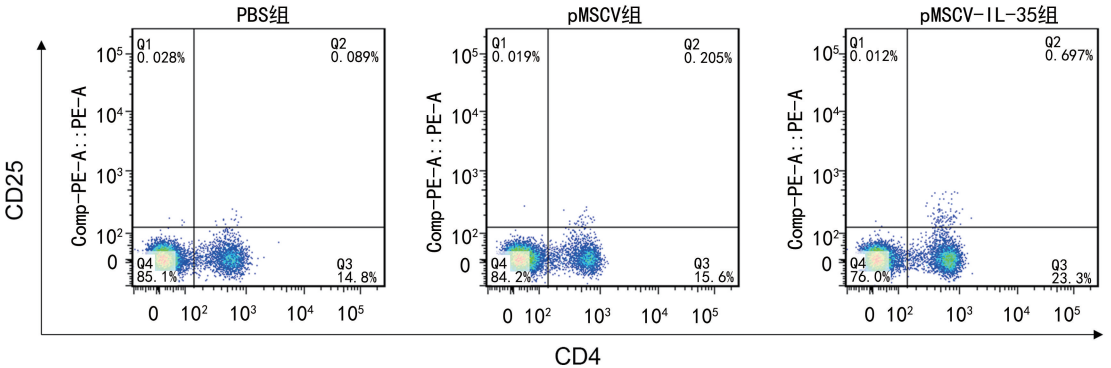


图 3 流式细胞术检测脾脏 CD4⁺ CD25⁺ Tregs 百分比

表 2 3 组小鼠脾脏 Ebi3 和 IL-12a mRNA 相对表达水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Ebi3	IL-12a
PBS 组	1.054±0.032 ^a	0.997±0.049 ^a
pMSCV 组	1.821±0.100 ^a	1.840±0.083 ^a
pMSCV-IL-35 组	5.744±0.121	5.769±0.523

^a: $P<0.001$, 与 pMSCV-IL-35 组比较。

表 3 3 组小鼠脾脏细胞分化百分比比较 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别	CD4 ⁺ T 淋巴细胞	CD8 ⁺ T 淋巴细胞	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs
PBS 组	13.89±5.98	14.43±8.25 ^a	0.09±0.03 ^a
pMSCV 组	11.88±4.39	13.73±1.66 ^a	0.22±0.02 ^a
pMSCV-IL-35 组	7.26±0.10	3.73±0.61	0.70±0.11

^a: $P<0.001$, 与 pMSCV-IL-35 组比较。

表 4 3 组小鼠脾脏 Gzmb 和 Foxp3 mRNA 相对表达水平比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Gzmb	Foxp3
PBS 组	1.02±0.23 ^a	1.03±0.32 ^a
pMSCV 组	1.22±0.32 ^a	1.05±0.04 ^a
pMSCV-IL-35 组	0.29±0.14	1.94±0.28

^a: $P<0.01$, 与 pMSCV-IL-35 组比较。

3 讨 论

IL-12 家族有 4 个成员: IL-12、IL-23、IL-27 和

IL-35^[13-14]。这 4 个成员有着相似的配体和结构特征,但是与其他 3 个成员不同的是,IL-35 具有独特的免疫调节功能^[15-16]。IL-12、IL-23 和 IL-27 主要由巨噬细胞、单核细胞和树突状细胞等抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs)在被病原体特异性模式识别激活后产生^[17]。IL-35 是 IL-12 细胞因子家族的新成员,是由 α 链 p35 和 β 链 Ebi3 组成的异源二聚体,主要由 CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs 合成并分泌^[10]。Ebi3 是 Foxp3 的下游靶点, COLLISON 等^[11] 研究报道,将 Tregs 与效应性 T 淋巴细胞(Teffs)共培养时, Ebi3 和 IL-12a mRNA 水平明显上调,表明后者可能是免疫调节过程的积极参与者,并促进了 IL-35 的产生,这也解释了 Tregs 表达 IL-35 的原因。反过来, IL-35 的存在也会诱导 T 淋巴细胞向 Tregs 分化^[18]。这种特殊的免疫调节作用使得 IL-35 被广泛应用于各种免疫性疾病与器官移植免疫排斥反应的治疗中^[19-20]。作者前期分别利用大肠杆菌为肠道固有菌株及尾静脉注射的间充质干细胞易于在肺部滞留的特性,通过灌胃 IL-35 修饰的大肠杆菌治疗葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的小鼠溃疡性结肠炎,另通过尾静脉注射 IL-35 修饰的间充质干细胞治疗脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤,探讨 IL-35 表达在上述两种炎症模型中的应用。结果发现,IL-35 的表达可减轻两种疾病小鼠体内炎性损伤及炎性细胞的浸润,促进 Tregs 增

殖分泌,减少辅助性 T 淋巴细胞 17(Th17)的数量^[21-22],为炎症相关疾病的治疗提供了新的思路和方法。但现有的结果主要来自疾病模型,在没有抗原刺激的情况下 IL-35 是否会影响 T 淋巴细胞亚群的分化尚不明确,因此本研究对此进行探索。

本研究将一种可以在体内表达 IL-35 的载体(Ebi3 和 IL-12a 融合基因表达载体)通过尾静脉注射到小鼠体内,观察 IL-35 表达对 T 淋巴细胞亚群分化的影响。72 h 后取小鼠脾脏,RT-qPCR 检测 IL-35 两个亚基 Ebi3 和 IL-12a mRNA 的表达水平。结果显示,pMSCV-IL-35 组的小鼠脾脏 Ebi3 和 IL-12a mRNA 表达水平较 PBS 组、pMSCV 组明显升高,说明在接受 pMSCV-IL-35-GFP 质粒的小鼠中可观察到 Ebi3 和 IL-12p35 的高表达。进一步通过流式细胞术检测表达的 IL-35 对小鼠脾脏 T 淋巴细胞(包括总 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞和 CD4⁺CD25⁺ Tregs)分型的影响,结果显示,与 PBS 组、pMSCV 组相比,pMSCV-IL-35 组小鼠 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比无明显变化,CD8⁺ T 淋巴细胞百分比明显降低,而 CD4⁺CD25⁺ Tregs 百分比明显升高;另外,CD8⁺ T 淋巴细胞免疫功能分子 Gzmb mRNA 相对表达水平明显降低,而 Tregs 特异性转录因子 Foxp3 mRNA 相对表达水平明显升高。这说明表达产生的 IL-35 可以影响 T 淋巴细胞分化,一方面可抑制杀伤性 T 淋巴细胞的活性,另一方面可诱导 Tregs 产生。杀伤性 T 淋巴细胞是以 CD8⁺ 分子为主要标记的一类 TefFs,具有细胞毒性^[23-24];而 Tregs 则是以 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ 为主要特征且被研究者普遍认为具有免疫抑制特性的细胞亚群^[6,25-26],提示 IL-35 对 TefFs 具有免疫抑制作用,而它的存在促进 T 淋巴细胞向 Tregs 方向分化^[11]。IL-35 的免疫抑制能力已经在部分疾病模型中得到了说明^[27-30],这里列出的基于正常健康小鼠的数据可以在一定程度上帮助理解 IL-35 对正常机体的影响及潜在的疾病防治机制,并为 IL-35 基因应用于体内免疫治疗提供理论依据。但是,本研究是在正常动物中进行的,结果可能与病理条件下有所不同,如与 PBS 组相比,pMSCV 组小鼠体内 CD4⁺CD25⁺ Tregs 百分比一定程度增加,可能是由于外源性 pMSCV 质粒使小鼠产生了一定程度的免疫应激现象,并进一步激活了机体自身对免疫应答的调节功能,诱导了 Tregs 的分化。

综上所述,IL-35 作为 IL-12 家族中发挥免疫抑制作用的细胞因子,其从正常及疾病状态下对免疫系统的调节潜能为炎症性疾病和免疫性疾病的治疗奠定了理论基础。但 IL-35 的受体及相应下游信号通路

也暂未完全阐明,目前相关临床和基础研究的数据也十分有限,有待深入探究。

参考文献

- [1] WANG H, WANG Z, WU Q, et al. Regulatory T cells in ischemic stroke[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(6): 643-651.
- [2] GUO W W, SU X H, WANG M Y, et al. Regulatory T cells in GVHD therapy[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 697854.
- [3] JIANG Q, YANG G, LIU Q, et al. Function and role of regulatory T cells in rheumatoid arthritis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 626193.
- [4] MARTIN-MORENO P L, TRIPATHI S, CHANDRAKER A. Regulatory T cells and kidney transplantation[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13(11): 1760-1764.
- [5] JUNEJA T, KAZMI M, MELLACE M, et al. Utilization of Treg cells in solid organ transplantation [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 746889.
- [6] ZOHOURI M, MEHDIPOUR F, RAZMKHAH M, et al. CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T cells: a distinct subset or a heterogeneous population? [J]. *Int Rev Immunol*, 2021, 40(4): 307-316.
- [7] SHAO Y, YANG W Y, SAAOUD F, et al. IL-35 promotes CD4⁺Foxp3⁺ Tregs and inhibits atherosclerosis via maintaining CCR5-amplified Treg-suppressive mechanisms[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(19): e152511.
- [8] SHU Y, HU Q, LONG H, et al. Epigenetic variability of CD4⁺CD25⁺ Tregs contributes to the pathogenesis of autoimmune diseases[J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017, 52(2): 260-272.
- [9] LIU K, HUANG A, NIE J, et al. IL-35 regulates the function of immune cells in tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 683332.
- [10] YE C, YANO H, WORKMAN C J, et al. Interleukin-35: structure, function and its impact on immune-related diseases[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2021, 41(11): 391-406.
- [11] COLLISON L W, WORKMAN C J, KUO T T, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to

- regulatory T-cell function[J]. *Nature*, 2007, 450 (7169): 566-569.
- [12] BARRY M, BLEACKLEY R C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(6): 401-409.
- [13] VIGNALI D A, KUCHROO V K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(8): 722-728.
- [14] MIRLEKAR B, PYLAYEVA-GUPTA Y. IL-12 family cytokines in cancer and immunotherapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(2): 167.
- [15] EGWUAGU C E, YU C R, SUN L, et al. Interleukin 35: critical regulator of immunity and lymphocyte-mediated diseases [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(5): 587-593.
- [16] SUN T, ZHANG D, YANG Y, et al. Interleukin 35 may contribute to the loss of immunological self-tolerance in patients with primary immune thrombocytopenia[J]. *Br J Haematol*, 2015, 169(2): 278-285.
- [17] TAIT WOJNO E D, HUNTER C A, STUMHOFER J S. The immunobiology of the interleukin-12 family: room for discovery[J]. *Immunity*, 2019, 50(4): 851-870.
- [18] PENG W, WANG L, ZHANG H, et al. Effects of recombinant IL-35-BCG on Treg/Th17 cell imbalance and inflammatory response in asthmatic newborn mice induced by RSV[J]. *Inflammation*, 2021, 44(6): 2476-2485.
- [19] CHOI J, LEUNG P S, BOWLUS C, et al. IL-35 and autoimmunity: a comprehensive perspective [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2015, 49(3): 327-332.
- [20] ZHAO N W. Interleukin (IL)-35 is raising our expectations[J]. *Rev Med Chil*, 2010, 138(6): 758-766.
- [21] ZHANG B, LIU Y, LAN X, et al. Oral *Escherichia coli* expressing IL-35 meliorates experimental colitis in mice[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 71.
- [22] ZHANG X, ZHANG Z, JU M, et al. Pretreatment with interleukin 35-engineered mesenchymal stem cells protected against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via pulmonary inflammation suppression[J]. *Inflammopharmacology*, 2020, 28(5): 1269-1281.
- [23] FARHOOD B, NAJAFI M, MORTEZAEI K. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: a review[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 8509-8521.
- [24] REINA-CAMPOS M, SCHARPING N E, GOLDRATH A W. CD8⁺ T cell metabolism in infection and cancer[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(11): 718-738.
- [25] MOTTET C, GOLSHAYAN D. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use [J]. *Swiss Med Wkly*, 2007, 137(45/46): 625-634.
- [26] QIN S, LI L, LIU J, et al. CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells regulate immune balance in unexplained recurrent spontaneous abortion via the Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B pathway [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(12): 300060520980940.
- [27] JIA D, JIANG H, WENG X, et al. Interleukin-35 promotes macrophage survival and improves wound healing after myocardial infarction in mice[J]. *Circ Res*, 2019, 124(9): 1323-1336.
- [28] WANG R X, YU C R, DAMBUZA I M, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease [J]. *Nat Med*, 2014, 20(6): 633-641.
- [29] SUZUKI M, YOKOTA M, NAKAMURA Y, et al. Intranasal administration of IL-35 inhibits allergic responses and symptoms in mice with allergic rhinitis[J]. *Allergol Int*, 2017, 66(2): 351-356.
- [30] XU C, ZHU H, SHEN R, et al. IL-35 is a protective immunomodulator in brain ischemic injury in mice[J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(7): 1454-1463.

(收稿日期: 2022-11-18 修回日期: 2023-03-28)

(编辑: 冯甜)